

7

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-126071

(43)Date of publication of application : 27.04.1992

(51)Int.Cl.

C12M 3/00

C12N 5/06

C12N 11/00

(21)Application number : 02-248454

(71)Applicant : KAO CORP
TOKYO JIYOSHI IKA UNIV

(22)Date of filing : 17.09.1990

(72)Inventor : OKANO MITSUO
YAMADA NORIKO
SAKURAI YASUHISA
SAKAI HIDEAKI
NAKAMURA KOICHI

(54) CARRIER FOR CELL CULTURE

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide the subject carrier capable of separating and recovering cultured cells from the surface of a base material without requirement of using a protease, a chemical reagent, etc., by coating the surface of the base material with a polymer containing cell-bonding groups and having a critical solution temperature to water within a prescribed range.

CONSTITUTION: A polymer containing cell-bonding groups such as an ionic group (e.g. carboxylate group or sulfonate group) or an ion forming group (e.g. amidation group or esterification group) and having 0-80° C critical solution temperature to water is prepared. As preferable examples of the polymer, an N-isopropylacrylamide/ sodium acrylate copolymer is exemplified. With the above-mentioned polymer, the surface of a base material is then coated utilizing a chemical reaction or a physical interaction, thus producing the objective carrier for cell culture. By culturing and growing cells using the resultant carrier, cultured cells can readily be separated and recovered from the carrier.

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平4-126071

⑤ Int. Cl.⁵

C 12 M 3/00
C 12 N 5/06
11/00

識別記号

Z

庁内整理番号

9050-4B

⑬ 公開 平成4年(1992)4月27日

2121-4B

7236-4B

C 12 N 5/00

E

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全9頁)

⑭ 発明の名称 細胞培養用支持体

⑯ 特 願 平2-248454

⑰ 出 願 平2(1990)9月17日

⑱ 発 明 者 岡 野 光 夫 千葉県市川市国府台6-12-12
⑱ 発 明 者 山 田 則 子 東京都板橋区前野町6-10 前野町ハイツ1-601
⑱ 発 明 者 桜 井 靖 久 東京都杉並区永福3-17-6
⑱ 発 明 者 坂 井 秀 昭 和歌山県那賀郡岩出町畑毛310-3 フレグランス畑毛210
⑱ 発 明 者 中 村 浩 一 和歌山県和歌山市園部1030-15
⑲ 出 願 人 花 王 株 式 会 社 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号
⑲ 出 願 人 学校法人東京女子医科 東京都新宿区河田町8-1
大学
⑲ 代 理 人 弁理士 青 山 葆 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

細胞培養用支持体

2. 特許請求の範囲

1. 細胞付着性基を有し且つ水に対する臨界溶解温度が0~80℃であるポリマーを、基材表面上に被覆してなる事を特徴とする細胞培養用支持体。

2. 細胞付着性基がイオン性基及び又はイオン生成基である請求項1記載の細胞培養用支持体。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、生化学、医学および免疫学等における細胞類の培養用支持体に関するものである。

[従来の技術]

従来細胞培養は、ガラス表面上あるいは種々の処理を行った合成高分子材料の表面上にて行われていた。例えば、ポリスチレンを材料とする表面処理(例えばγ線照射、シリコンコーティング等)を行った種々の容器が、細胞培養用支持体として

普及している。従来、このような細胞培養用支持体を用いて培養・増殖した細胞は、トリプシンのような蛋白分解酵素や化学薬品により処理することで支持体表面から剥離・回収されていた。

しかしながら、上述のような処理を施して増殖した細胞を回収する場合、①処理工程が煩雑になり、不純物混入の可能性が多くなること、②増殖した細胞が上記処理により変性し、細胞本来の機能が損なわれる例があること、等の欠点が指摘されている。

そこで本発明者等は上記欠点を解消するために、トリプシンやEDTAのような蛋白分解酵素や化学薬品等による処理を施さず、環境温度を変化させるだけで、培養・増殖させた細胞を支持体表面から剥離・回収することが可能な細胞培養に使用する支持体材料を以前に提案した(特願平1-31844号)。

[発明が解決しようとする課題]

本発明は、上記出願の発明を更に発展させ、細胞の剥離・回収がより効果的に行える細胞培養用

支持体を提供することを、目的とする。

[課題を解決するための手段]

上記目的を達成するため、基材上を或る種のポリマーで処理した細胞培養用支持体を使用すれば、より多くの細胞を培養出来、且つ温度を変化させるだけでその培養細胞を容易に回収することが可能であり、しかもこの回収操作は細胞を培養した培養液中においても可能であり、さらにその剥離した細胞は集合状態を保持していることを見出し、本発明を成すに至った。

即ち本発明は、細胞付着性基を有し且つ水に対する臨界溶解温度が $0 \sim 80^{\circ}\text{C}$ であるポリマーを、基材表面上に被覆してなる事を特徴とする細胞培養用支持体を提供する。

本発明の細胞培養用支持体(以下単に、「支持体」と言うこともある。)は、ポリマーを基材表面上に被覆することにより形成される。このポリマーは、官能基として細胞付着性基を有することを特徴とする。「細胞付着性基」とは、培養しようとする細胞を容易に効果的に支持体に付着させ、それ

基及びエステル化基等が挙げられ、更にヒドロキシル基等も含まれる。その他の細胞付着性基としては、例えばアルキル基(特に長鎖アルキル基、例えばステアリル基、ラウリル基等)、メルカプト基、エーテル基、チオエーテル基、ポリエーテル基、ケトン基、アルデヒド基、アシル基、シアノ基、ニトロ基、アシルアミノ基、ハロゲン基、グリシジル基、アリル基等が挙げられる。上記細胞付着性基は、1種以上ポリマー中に存在してもよい。尚、複数種が存在する場合、それらはそれぞれの基がポリマー中に単独で存在してもよいし、或るいはそれらが同一の置換基中に存在した複合基(例えばペタイン基等)としてポリマー中に存在してもよい。

更に、基材表面上に被覆するのに使用する本発明のポリマーは水に対する臨界溶解温度が $0 \sim 80^{\circ}\text{C}$ である事も特徴とする。尚「臨界溶解温度」とは、2層分離している2種の物質が或る温度になると互いに完全溶解し均一層となるその温度のことを言う。特に、温度を上げて完全溶解に達する

により、より多くの細胞を増殖培養させるものである。

そのような細胞付着性基としては、例えばイオン性基及びイオン生成基等が挙げられる。イオン性基としては、例えば陰イオン性基及び陽イオン性基等が挙げられる。陰イオン性基としては例えば酸性基の塩等が挙げられ、又陽イオン性基としては塩基性基の塩等が挙げられる。酸性基としては、具体的にはカルボン酸基、スルホン酸基、リン酸基等が挙げられる。これらの塩としては、例えばアルカリ金属塩(例えばNa塩、K塩等)、アルカリ土類金属塩(例えばMg塩、Ca塩等)、アンモニウム塩等が挙げられる。塩基性基としては、具体的には1級、2級、3級アミノ基等が挙げられる。これらの塩としては、鉱酸塩(例えば塩酸塩、硫酸塩等)、有機酸塩(例えば酢酸塩、コハク酸塩等)、及び4級アンモニウム基(例えば、テトラメチルアンモニウム基等)が挙げられる。イオン生成基としては、例えば上記の酸性基、塩基性基の他に、上記酸性基の酸無水物化基、アミド化

場合の温度を「上限臨界溶解温度」、温度を下げて完全溶解する場合の温度を「下限臨界溶解温度」と言うことがある。水に対する臨界溶解温度は通常、水(イオン交換水または蒸留水)との溶解相図を作成して求める。水との溶解相図は臨界溶解温度を求めるポリマーの種々の濃度(重量分率、容積分率、モル分率、モル比等いずれの単位を用いても構わない。)の水溶液を調製し、各々の温度を上下させ、①目視により2相分離を確認する方法の他、②臨界タンパク光の観測による方法、③散乱光強度の観測による方法、④透過レーザー光の観測による方法等一般に知られている方法のいずれかを用いて、また、組み合わせ用いて作成される。

本発明に用いるポリマーの水に対する臨界溶解温度は、 $0 \sim 80^{\circ}\text{C}$ 、より好ましくは $0 \sim 50^{\circ}\text{C}$ である。臨界溶解温度が 80°C を超えると細胞が死滅する可能性があるので好ましくない。また臨界溶解温度が 0°C より低いと、一般に細胞増殖速度が極度に低下するか、または細胞が死滅してし

まうため好ましくない。

そのような本発明に用いるポリマーは、主モノマーと従モノマーを共重合して得られる。主モノマーは、ポリマーの臨界溶解温度をほぼ決定するものである。従ってそのような主モノマーは、その単独重合体の下限臨界溶解温度が0～80℃であるもの、或るいは上限臨界溶解温度が0～80℃であるものが好ましい。そのような主モノマーの具体例としては例えば、アクリルアミド、メタクリルアミドなどの(メタ)アクリルアミド化合物、N-エチルアクリルアミド(単独重合体の下限臨界溶解温度72℃)、N-n-プロピルアクリルアミド(同21℃)、N-n-プロピルメタクリルアミド(同27℃)、N-イソプロピルアクリルアミド(同32℃)、N-イソプロピルメタクリルアミド(同43℃)、N-シクロプロピルアクリルアミド(同45℃)、N-シクロプロピルメタクリルアミド(同60℃)、N-エトキシエチルアクリルアミド(同約35℃)、N-エトキシエチルメタクリルアミド(同約45℃)、N-テトラヒドロフル

リルアクリルアミド(同約28℃)、N-テトラヒドロフルフルメタクリルアミド(同約35℃)等のN-アルキル置換(メタ)アクリルアミド誘導体、N-エチル-N-メチルアクリルアミド(単独重合体の下限臨界溶解温度56℃)、N,N-ジエチルアクリルアミド(同32℃)等のN,N-ジアルキル置換(メタ)アクリルアミド誘導体、さらに、N-アクリロイルピロリジン(単独重合体の下限臨界溶解温度56℃)、N-アクリロイルピペリジン(同約6℃)等を代表とする1-(1-オキソ-2-プロベニル)-ピロリジン類、1-(1-オキソ-2-プロベニル)-ピペリジン類、4-(1-オキソ-2-プロベニル)-モルホリン、1-(1-オキソ-2-メチル-2-プロベニル)-ピロリジン、1-(1-オキソ-2-メチル-2-プロベニル)-ピペリジン、4-(1-オキソ-2-メチル-2-プロベニル)-モルホリン等のような環状基を有する(メタ)アクリルアミド誘導体、メチルビニルエーテル(単独重合体の下限臨界溶解温度35℃)等のビニルエーテル誘導体等が挙

げられ、これらの1種以上を使用してよい。

従モノマーは、ポリマー中の前記細胞付着性基の導入根拠となるもので、前記細胞付着性基を有する共重合性モノマーが好ましい。そのような従モノマーの具体例としては例えばアクリル酸、メタクリル酸、2-メタクリロキシエチルコハク酸、2-メタクリロキシエチルマレイン酸、2-メタクリロキシエチルフタル酸、2-メタクリロキシエチルヘキサヒドロフタル酸等で挙げられるようなカルボン酸基、その中和塩(例えばアルカリ(土類)金属塩)基、及び酸無水物基含有モノマー；スチレンスルホン酸、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸、メタクリル酸2-スルホエチル、アクリル酸3-スルホプロピルエステル等で挙げられるようなスルホン酸基、その中和塩基、スルホン酸エステル基、及びスルホン酸アミド基含有モノマー；アクリロキシエチルフォスフェート、メタクリロキシエチルフォスフェート、メタクリロキシプロピルフォスフェート等で挙げられるようなリン酸基及びその中和塩基含有モノ

マー；メタクリル酸ジメチルアミノエチル、メタクリル酸ジエチルアミノエチル、メタクリル酸ジエチルトリメチルアンモニウムクロライド、メタクリル酸エチルジメチルアンモニウムベンジルクロライド等で挙げられるようなアミノ基及びその中性化基含有モノマー；アクリル酸ヒドロキシエチル、メタクリル酸ヒドロキシエチル、メタクリル酸ヒドロキシプロピル等で挙げられるような水酸基含有モノマー；その他長鎖アルキル基、メルカプト基、エーテル基、チオエーテル基、ポリエーテル基、ケトン基、アルデヒド基、アシル基、シアノ基、ニトロ基、アシルアミノ基、ハロゲン基、グリシジル基、アリル基等を含有するモノマー；さらに、これらの細胞付着性基を同一モノマー内に複合して含有するモノマー(例えば、N-(3-スルホプロピル)-N-メタクリロキシエチル-N,N-ジメチルアンモニウムベタイン)等が挙げられる。これらのうち、特にイオン性基又はイオン生成基を有するモノマーが好ましい。本発明ではこれらの従モノマーを単独で、或るいは2種

類以上を併用して用いられる。

前記主モノマーと上記従モノマーの組成比は、得られる共重合体が臨界溶解温度を有し、かつその温度が80〜0℃内に存在するような共重合比率でなければならない。具体的には、上記細胞付着性従モノマーの配合量は、その種類及び対象とする細胞種等によって異なるが、例えば、N-イソプロピルアクリルアミド等の主モノマーに対して、20wt%以下であり、好ましくは、10wt%以下である。20wt%を超えると、得られる共重合体が0〜80℃の範囲内に臨界溶解温度を示さなくなり好ましくない。

上記のように本発明に使用するポリマーは、一般に主モノマーと従モノマーを共重合することにより得られるが、増殖細胞の種類によって臨界溶解温度を調節する必要がある場合や、被覆物質と細胞培養支持体との相互作用を高める必要が生じた場合や、細胞支持体の親水・疎水性のバランスを調整する場合などは、上記以外のモノマー類を更に加えて得られる共重合体、他のポリマーと本

でも構わない。

被覆を施される基材の材質は、通常細胞培養に用いられるガラス、改質ガラス、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等の高分子化合物、あるいはセラミックス、金属等が挙げられる。尚、基材表面はオゾン処理、プラズマ処理、スパッタリング等の処理技術を用いて親水化を施されたものでも良い。形状は、ペトリディッシュに限定されることはなく、プレート、ファイバー、(多孔質)粒子、また、一般に細胞培養等に用いられる容器の形状(フラスコ等)を付与されていても構わない。

基材へのポリマーの被覆方法は、基材と上記被覆物質を①化学的な反応によって結合させる方法、②物理的な相互作用を利用する方法、を単独または併用して行うことができる。被覆時にモノマーを使用する場合、そのモノマーは気体、液体、固体いずれの状態でも良い。また、(コ)ポリマーを使用する場合にはにおいても、そのポリマーは、液体、固体状態のいずれの状態でも良い。これら

発明のポリマーとのグラフトまたはブロック共重合体、あるいは他のホモポリマー及び／又はコポリマーと本発明のポリマーとの混合物を用いてもよい。また、ポリマー本来の性質が損なわれない範囲で架橋することも可能である。

上記主及び従モノマー以外のモノマー類としては、例えば(メタ)アクリル酸メチル、(メタ)アクリル酸エチル、(メタ)アクリル酸ブチル、スチレン等が挙げられる。

上記他のホモ及びコポリマーとしては、例えばポリ(メタ)アクリル酸メチル、ポリ(メタ)アクリル酸エチル、ポリ(メタ)アクリル酸ブチル、ポリスチレン等が挙げられる。

その他共重合に際しては、必要に応じ溶剤(例えば、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、トルエン、ベンゼン等)等を添加してもよい。

本発明の細胞培養用支持体は、適当な基材上に上記ポリマーを被覆して得られるが、基材表面は全面が被覆されていても、部分的に被覆されてい

のものを①化学的な反応によって結合させる場合、電子線照射(EB)、 γ 線照射、紫外線照射、プラズマ処理、コロナ処理、さらに細胞付着性基材と被覆材料が適当な反応性官能基を有する場合は、ラジカル反応、アニオン反応、カチオン反応等の一般に用いられる有機反応を用いることができる。

②物理的な相互作用による方法としては、被覆材料単独または基材との相溶性の良いマトリックスを媒体とし、塗布、混練等の物理的吸着を用いる方法等があるが、これらに限られるわけではない。

また、細胞支持体上に培養した細胞を支持体から剥離させ回収するには、上限臨界溶解温度以上もしくは下限臨界溶解温度以下にするだけで良く、細胞を培養していた培養液においてもその他の等張液においても可能であり目的に合わせて選択することができる。

【作用】

本発明の細胞培養用支持体によれば、細胞増殖時には、細胞は細胞付着性基に接着し、効果的に増殖をする。細胞剥離時には、下層部である臨界

溶解温度が0～80℃の範囲にあるポリマーにおいて水分子の占める体積分率が上昇するため細胞は水中に溶解することになる。

以下本発明の作用を、主モノマーとしてN-イソプロピルアクリルアミド、従モノマーとしてアクリル酸ナトリウム塩を用いた場合を例にとり、より具体的に説明する。N-イソプロピルアクリルアミド/アクリル酸ナトリウム塩コポリマーは水溶液中で約32℃に下限臨界溶解温度を有する。例えば、一般に細胞培養用ペトリディッシュ材料として用いられるポリスチレン基材上でN-イソプロピルアクリルアミドとアクリル酸ナトリウムを電子線照射(EB)により共重合を行なうとポリスチレンは生成コポリマーにより被覆されるが、下限臨界溶解温度である32℃以上ではこのコポリマーはその占有体積が小さくなりコポリマー中の水分子を排除して、支持体表面は疎水性を示す。しかし、逆に32℃以下ではコポリマーの占有体積は大きくなりコポリマー中の水分子の占める体積分率が上昇し、支持体表面は親水性を示すよう

来る等の有利な点を持つ。

更に、従来の細胞培養用支持体は一般にその支持体表面の状態に細胞の培養・回収機能が大きく依存するが、本発明によれば支持体の表面状態に左右されることなく機能が一律に発現するため、製品の品質が安定し、歩留りも良好となる上に細胞の種類に応じて最適な従モノマー種/配合量を選択することも可能となる。

[実施例]

以下、本発明を実施例により、より具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

(実施例1)

基材としてベクトン・ディキンソン・ラブウェア(Becton Dickinson Labware)社製ファルコン(FALCON)3002ペトリディッシュを用い、培養細胞としてウシ大動脈血管内皮細胞を採用した。

ペトリディッシュ基材表面を被覆するために、N-イソプロピルアクリルアミドを40wt%濃度

になる。従って温度を制御するだけで、支持体表面の親水・疎水性がコントロールでき細胞の支持体への接着性が変化する。その結果温度を変化させるだけで培養・増殖後の細胞を破壊することなく細胞支持体から容易に剥離、回収することが可能となるものと考えられる。

又アクリル酸ナトリウム塩で共重合させているので、被覆された生成コポリマーは、細胞付着性を有する。そのため細胞を効率良く付着させ、より多くの細胞を増殖させることが可能となる。

[発明の効果]

本発明に於いては、トリプシンやEDTAのような蛋白分解酵素や化学薬品等による処理を経ずに、細胞培養用支持体から培養細胞を剥離・回収することができるので、①処理工程が簡略化される、②不純物等の混入の可能性が完全になくなる、③増殖した細胞が化学的処理により細胞膜が障害されるということがなく、細胞本来の機能が損なわれない、④剥離した細胞が集合状態を保持している、⑤細胞の培養・回収を繰返し行なう事が出

でエタノールに溶解させ、この中にアクリル酸をN-イソプロピルアクリルアミドに対し1wt%溶解させた。このエタノール溶液0.3mlを3002ペトリディッシュ上に添加後、20Mradの電子線を照射した。電子線照射終了後、イオン交換水によりペトリディッシュを洗浄し、残存モノマー及びペトリディッシュ表面に結合していないコポリマーもしくはホモポリマーを取り除いた。次に、ペトリディッシュ表面に被覆されたアクリル酸成分内のカルボン酸を中和するため、10wt%水酸化ナトリウム水溶液を3ml(カルボン酸残基に対し過剰量)添加し、10分間静置し、その後イオン交換水で十分にペトリディッシュ表面を洗浄した。クリーンベンチ内で乾燥させ、さらにエチレンオキシド(EO)ガス滅菌を行ない、さらに十分脱気を行なうことにより、本発明である細胞培養支持体材料を得た。

ウシ大動脈血管内皮細胞の培養は、得られた細胞培養支持体材料上にて、ウシ胎児血清(FCS)を10%含むダルベッコ改変イーグル培地(D

MEM)を培地として、5%二酸化炭素中、37℃で行なった。十分に細胞が増殖したのを確認した後、培養液を5℃に冷却し、30分間放置して、付着/増殖細胞を剥離させ、増殖細胞剥離回収率を下式に従って求めた。結果を表-1に示す。

$$\text{増殖細胞剥離回収率(\%)} = \frac{\text{剥離回収した細胞総数}}{\text{増殖させた細胞総数}} \times 100$$

(実施例2)

アクリル酸をN-イソプロピルアクリルアミドに対し0.5wt%溶解させる点以外は実施例1と同様にして、細胞培養支持体を得、その支持体上で細胞を培養しこれを剥離回収して、増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-1に示す。

(実施例3)

アクリル酸の代わりにメタクリル酸ジエチルアミノエチルをN-イソプロピルアクリルアミドに対し1wt%溶解させる点以外は実施例1と同様に、電子線照射およびイオン交換水による洗浄を行なった。このベトリディッシュにおいては中和は行な

剥離回収率を求めた。結果を表-1に示す。

(実施例6)

N-イソプロピルアクリルアミドの代わりにN-イソプロピルメタクリルアミドを利用し、アクリル酸の代わりにメタクリル酸をN-イソプロピルメタクリルアミドに対し0.3wt%溶解させる点以外は実施例1と同様にして、細胞培養支持体を得た。このものに対しては45℃で細胞を培養し、以下は実施例1と同様にこれを剥離回収して、増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-1に示す。

(実施例7)

N-イソプロピルアクリルアミドの代わりにN-n-プロピルアクリルアミドを利用し、またメタクリル酸ジエチルアミノエチルの代わりにメタクリル酸2-スルホエチルをN-n-プロピルアクリルアミドに対し10wt%溶解させる点以外は実施例3と同様にして、細胞培養支持体を得、その支持体上で細胞を培養しこれを剥離回収して、増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-1に示す。

わず、そのままクリーンベンチ内で乾燥させ、さらにEOガス滅菌を行ない、細胞培養支持体を得た。

細胞培養は実施例1と同様な方法で行ない、増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-1に示す。

(実施例4)

N-イソプロピルアクリルアミドの代わりにN-n-プロピルアクリルアミドを利用し、アクリル酸の代わりにメタクリル酸をN-n-プロピルアクリルアミドに対し1wt%溶解させる点以外は実施例1と同様にして、細胞培養支持体を得、その上で細胞を培養しこれを剥離回収して、増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-1に示す。

(実施例5)

N-イソプロピルアクリルアミドの代わりにN,N-ジエチルアクリルアミドを利用し、アクリル酸の代わりにメタクリル酸をN,N-ジエチルアクリルアミドに対し5wt%溶解させる点以外は実施例1と同様にして、細胞培養支持体を得、その上で細胞を培養しこれを剥離回収して、増殖細胞

す。

(実施例8)

N-イソプロピルアクリルアミドの代わりにN-エトキシエチルアクリルアミドを利用し、またメタクリル酸ジエチルアミノエチルの代わりにアクリル酸3-スルホプロピルエステルをN-エトキシエチルアクリルアミドに対し0.5wt%溶解させる点以外は実施例3と同様にして、細胞培養支持体を得、その支持体上で細胞を培養しこれを剥離回収して、増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-1に示す。

(比較例1)

ベクトン・ディキンソン・ラブウェア社製ファルコン3002ベトリディッシュを、表面処理を全く行わずにそのまま細胞培養支持体として用いた以外は、実施例1と同様な実験を行なった。結果を表-1に示す。

(比較例2)

基材としてベクトン・ディキンソン・ラブウェア社製ファルコン3002ベトリディッシュを用

い、被覆ポリマー用モノマーとしてN-イソプロピルアクリルアミドさらに架橋剤としてN,N'-メチレンビスアクリルアミド(対N-イソプロピルアクリルアミド0.5wt%)を用い、実施例1と同様にして支持体表面全体にポリマーを被覆し細胞支持体を得た。尚細胞付着性基を含有するモノマーは使用しなかった。このものを利用して実施例1と同様に細胞培養しこれを剥離回収し、増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-1に示す。

(比較例3)

アクリル酸をN-イソプロピルアクリルアミドに対し3.5wt%溶解させ、固形分が4.0wt%のエタノール溶液を利用する点以外は実施例1と同様にして、細胞培養用支持体を得、その支持体上で細胞を培養しこれを剥離回収して、増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-1に示す。

表-1

	増殖細胞剥離回収率(%)
実施例1	>90
実施例2	>90
実施例3	>90
実施例4	>90
実施例5	>90
実施例6	>90
実施例7	>90
実施例8	>90
比較例1	細胞が全く剥離せず(回収不可能)
比較例2	[細胞が付着/増殖せず]
比較例3	細胞が全く剥離せず(回収不可能)

なお、実施例、比較例とも支持体の親・疎水性を調べるためにフェース(FACE)接触角計(CA-D型)[協和界面科学株式会社製]および付属品として、三態系測定装置を用い、液滴法で接触角を測定した。結果を表-2に示す。

表-2

	37℃における 接触角(度)	5℃における 接触角(度)
実施例1	40	24
実施例2	41	24
実施例3	39	22
実施例4	45	33
実施例5	42	23
実施例6	40(45℃)	24
実施例7	44	31
実施例8	46	28
比較例1	57	63
比較例2	39	20
比較例3	40	39

表面処理を行なった実施例1、2、3、4、5、6、7、8では表-2に示されるように、支持体材料周囲の温度を37℃から5℃に下げることによって接触角が減少しており、これは、被覆されたN-イソプロピルアクリルアミド、n-プロピルアクリルアミド、N,N-ジエチルアクリルアミド、

N-イソプロピルメタクリルアミドまたはN-エトキシエチルアクリルアミドと、それぞれの実施例で示される細胞付着性を有するモノマーとの共重合物により支持体材料表面が疎水性から親水性へと変化していることを示している。このような材料を使用した実施例1、2、3、4、5、6、7、8の場合、表-1に示されるように、主に細胞付着性基に付着した細胞は、培養温度を低下させると培養支持体から良好に剥離し、回収することが可能であった。

一方、比較例1のように表面処理を施さない場合は、表-2に示されるように周りの温度を下げても接触角はほとんど変化せず、この支持体材料では表-1に示されるように、培養温度を低下させても付着細胞の剥離現象は、観察されず本発明での細胞培養支持体材料としては、不十分な性能であることが分かる。

さらに、比較例2のように支持体材料表面全体にポリマーを被覆し、細胞付着性基を有するモノマー成分が全く含まれない場合においては、表-

1に示す通り、細胞は付着／増殖せず、本発明での細胞培養支持体材料としては不十分な性能であることが分かる。

さらに、比較例3では、支持体材料表面への被覆部中に細胞付着性基を有するモノマー成分を含む場合細胞は付着するが、その細胞付着性基を有するモノマー成分が多いため、表-2に示す通り、支持体材料周囲の温度を37℃から5℃に下げても、表面の親・疎水性は変化せず付着細胞の剥離現象は観察されず、本発明での細胞培養支持体材料としては不十分な性能であることが分かる。

以上の結果より本発明を実現するためには、細胞付着性基を有し、かつその状態で臨界溶解温度が存在するようなポリマーを被覆しなければならぬことが分かる。

(実施例9)

実施例1で得られた剥離細胞の損傷度合を確認するため、これを遠心分離(600G, 5分)より回収し、得られた 2×10^5 個の細胞をベクトン・ディキンソン・ラブウェア社製ファルコン300

2ペトリディッシュ上で再び培養させた。細胞の培養は実施例1と同様の方法を採用した。結果を表-3に示す。

(比較例4)

比較例1で培養した付着細胞を0.05%トリプシン-0.02%EDTAで処理し、剥離させた細胞の損傷度合を確認するためこれを遠心分離(600G, 5分)することにより回収し、得られた 2×10^5 個の細胞をベクトン・ディキンソン・ラブウェア社製ファルコン3002ペトリディッシュ上で再び培養させた。培養は、実施例1と同様の方法を採用した。結果を表-3に示す。

表-3

	培養開始時の細胞数(個)	4日後の細胞数(個)
実施例9	2×10^5	2.5×10^5
比較例4	2×10^5	1×10^5

実施例9および比較例4の結果から剥離回収細胞の損傷度合については、表-3に示されるように、実施例9では培養開始時の1.3倍まで再増殖

させることが可能であるが、比較例4では5倍までしか再増殖させることができなかった。このことは、本発明の剥離回収細胞は従来のそれよりも損傷度が小さいことを意味する。

特許出願人 花王株式会社

学校法人 東京女子医科大学

代理人 弁理士 青山 藤 (ほか2名)

手続補正書

平成 3年 8月 1日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

平成 2年 特許願 第248454号

2. 発明の名称

細胞培養用支持体

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 花王株式会社

(他1名)

4. 代理人

住所 〒540 大阪府大阪市中央区城見2丁目1番61号
ツイン21 MIDタワー内 電話(06)949-1261
FAX(06)949-0361

氏名 弁理士 (6214) 青山 藤

5. 補正命令の日付

自 発

6. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄



7. 補正の内容

(1) 明細書第 10 頁下から第 8 行～第 7 行、「含有するモノマー」の後に「〔例えば、(メタ)アクリル酸ステアリル、(メタ)アクリル酸ラウリル、アクリル酸 2-メトキシエチル、アクリル酸 2-エトキシエチル、メタクリル酸ポリエチレングリコール、メタクリル酸ポリプロピレングリコール、アクロレイン、メタクロレイン、酢酸ビニル、酢酸アリル、メタクリル酸 2-シアノエチル、メタクリル酸 2-ニトロエチル、o-ニトロフェニルメタクリレート、N-[1-(4-クロロフェニル)エチル]メタクリルアミド、アクリル酸 2-クロロエチル、(メタ)アクリル酸グリシジル、(メタ)アクリル酸アリル、メタアクリル酸アリルオキシメチル等]」を挿入する。

(2) 同第 11 頁第 4 行、「80～0」とあるを「0～80」に訂正する。

以上